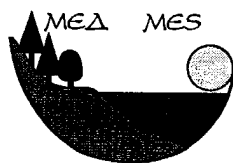

МАКЕДОНСКО ЕКОЛОШКО ДРУШТВО
MACEDONIAN ECOLOGICAL SOCIETY



III КОНГРЕС НА ЕКОЛОЗИТЕ НА МАКЕДОНИЈА
СО МЕЃУНАРОДНО УЧЕСТВО

*и обележување на 80-годишнината од животот на
проф. д-р Љупчо Групче и 60 години научна работа*

ЗБОРНИК НА ТРУДОВИ

PROCEEDINGS

**III CONGRESS OF ECOLOGISTS OF THE REPUBLIC OF
MACEDONIA WITH INTERNATIONAL PARTICIPATION**

*and marking the 80-Anniversary of Prof. Dr. Ljupčo Grupče's life
and 60 years active scientific work*

Хотел Дрим, Струга, Република Македонија

06-09.10.2007 година

Hotel Drim, Struga, Republic of Macedonia

06-09.10.2007

Скопје 2008 Skopje

ПРИМЕНА НА АНДРОГЕНЕЗАТА КАКО МЕТОД ЗА ПОДОБРУВАЊЕ НА РАЗНОВИДНОСТА НА ЗЕМЈОДЕЛСКИТЕ КУЛТУРИ

Лилјана КОЛЕВА-ГУДЕВА¹, Фиданка ТРАЈКОВА¹ и Мирко СПАСЕНОСКИ²

¹ Универзитет „Гоце Делчев“ Штип, Земјоделски Факултет,
ул. „Крсте Мисирков“ б.б. П. Факс 201, 2 000 Штип

² Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ Природно-математички Факултет,
Институт за биологија, ул. „Архимедова“ бр. 5, П. Факс 162, 1 000 Скопје

ИЗВОД

Колева-Гудева Л. Трајкова Ф. и Спасеноски М. (2008): Примена на андрогенезата како метод за подобрување на разновидноста на земјоделските култури. Зборник на трудови од III Конгрес на еколозите на Македонија со меѓународно учество, 06-09.10.2007, Струга. Посебни изданија на Македонското еколошко друштво, Кн. 8, Скопје.

Андрогенезата која се одвива во услови *in vitro* е најнов и најсигурен метод за добивање на хаплоидни единки, каде вегетативното или генеративното јадро од поленовото зрно се стимулира да се развие во хаплоидна единка, без понатамошно оплодување.

И покрај тоа што андрогенезата е возможна кај многу видови на земјоделски култури и дрвја, способноста на секој вид за успешна пропација на микроспорите често е ограничена на само еден генотип или варитет. Причината за оваа рестриктивна појава сè уште е непозната, и за жал андрогенетски успешните генотипови често пати немаат комерцијално значење.

Хаплоидните растенија се идеален материјал за испитување од областа на генетиката и селекцијата на растенијата. Од друга страна честотата на спонтаното добивање на хаплоиди по природен пат кај земјоделските култури е многу ниска. Затоа, една од поважните методи во областа на *in vitro* култивирање на растителните видови е токму создавањето на голем број на хаплоидни и диhaплоидни единки за краток временски период. Овие хаплоиди/диhaплоиди се основа за генетичките и цитогенетичките испитувања кои би ја оправдале целокупната постапка.

Клучни зборови: *in vitro*, култура на антери, пиперка *Capsicum annuum* L., хаплоиди, диhaплоиди.

ABSTRACT

Koleva-Gudeva L., Trajkova F. & Spasenoski M. (2008): Application of androgenesis as a method for improvement of crops. Proceedings of the III Congress of Ecologists of the Republic of Macedonia with International Participation, 06-09.10.2007, Struga. Special issues of Macedonian Ecological Society, Vol. 8, Skopje.

Androgenesis, a process that takes place in *in vitro* conditions, is the news and the most secured method for development of haploid plants, where the vegetative or generative nucleus of pollen grain are stimulated to be developed into haploid plant, without further fertilization.

Beside the fact that androgenesis is possible in many crops and trees, the ability of each species for successful propagation of microspores is limited to one genotype or variety. The reason for such restriction is still unknown and unfortunately androgenetically successful genotypes are without commercial importance.

Haploid plants are ideal material for plant genetics and breeding research. On the other hand, the frequency of spontaneous production of haploids of crops is very low. Therefore, one of the most important methods of *in vitro* cultivation of plants is production of number of haploids and dihaploids for short time. Those haploids/dihaploids are a base for further cytogenetics research studies which will justify the procedure.

Key words: *in vitro*, anther culture, pepper *Capsicum annuum* L., haploids, dihaploids.

Вовед

Создавањето на сорти на земјоделски култури, кои одговараат на модерните потреби, е долготраен и макотрпен процес што резултира од брзата генетска дегенерација на материјалот за одгледување како резултат на неконтролирана страна полинација. Овие потешкотии во конвенционалниот процес на одгледување можат да се надминат преку воспоставување и вовед на прецизни и соодветни методи за *in vitro* производство на хаплоидни регенеранти од микроспорно потскло од антерна култура и диплоидизација на геном.

Генетичарите и одгледувачите имаат поголем број потешкотии во добивањето на хаплоидни растенија а бројот на растителните видови кај кои хаплоиди спонтано се добиваат *in vivo* е само нешто повеќе од 100, но оваа во природата е сосема ретко (Колева-Гудева, 2003).

Хаплоидните растенија се идеален материјал за генетско проучување поради вкупното изразување на генетскиот потенцијал и мутации, од кои дел остануваат невидливи во рецесивна форма во диплоидните организми. Хаплоидните растенија се извонредно вредни во хетерозичната селекција, во процесот на подобрување на разновидноста на земјоделските култури. Со мултипликција на нивниот хромозомски број се добиени изогенетски линии, чие создавање во традиционалната селекција бара еден долг временски период, придружен со интервидовата селекција и back-cross оплодување, со контролирано само-опрашување и селекција на оделни индивидуални растенија.

Забрзаното добивање на стабилни хомозиготни линии е предност кое е возможно само со хаплоидната селекција и тешко може да се постигне со други методи на селекција.

Хаплоидите ги зголемуваат можностите за користење на целиот спектар на генетската разновидност преку брза генотипска селекција на квалитативни и квантитативни карактеристики. Според некои автори, хаплоидноста изразува значајна предност во случаите кога материјалите се со голем степен на хетерозиготност и кога голем број гени се пренесени со процесот на хибридизација. Присуството на единечен број на хромозоми во хаплоидниот кариотип подржува исто така и селекција на мутантни форми, добиени под влијание на физички или хемиски мутагенетски фактори или спонтано во процесот на *in vitro* култивацијата - гаметоклона варијабилност. Андрогенезата во *in vitro* услови, базирана на 30 годишно истражување, претставува ефективен метод за индукција на хаплоиди (Koleva-Gudeva, 2007)

Сите горе-наведени факти ги мотивираа

нашите интереси за добивање на хаплоиди / ди-хаплоиди и можностите тие да бидат користени за создавање и стабилизација на генетска разновидност кај пиперката, култура која за македонското земјоделско производство, и за регионот, е од огромно значење.

Материјал и методи

Како материјал за индукција на андрогенеза во култура на антери се користени незрелите пупки од пиперка, кои содржат антери со микроспори во стадиум на првата поленова делба или непосредно пред делбата. Испитувањата се изведени со 21 различни генотипови на пиперка. Стерилизацијата на пупките се одвиваше на следниот начин: најпрво пупките се промиваат во водоводна вода; потоа следи промивање во дестилирана вода; потоа 15 секунди во 70% C_2H_5OH ; па 10 минути во 5% $Ca(ClO)_2$ со 2-3 капки Tween 20, и на крај пупките се промиваат неколкупати во стерилна вода.

Потоа, изолирани антери од 3 пупки беа поставени во петриеви садови со пречник од 5 cm и тоа со конкавната страна да го допираат индуктивниот CP медиум (Слика 1a). Стадиумот на делбата на микроспората беше одредуван микроскопски со обојување на антерите неколку минути со ацето-кармин, а потоа истите беа микроскопирани. Тоа обично е фаза на цветната пупка кога должината на цветните и венечните ливчина е еднаква и кога слободниот крај на антерата почнува да се обојува бледо виолетово. На изолираните антери се капнува од ацето-карминот и по неколку минути истите се мацерираат на микроскопско предметно стакло и се набљудуваа во кој стадиум е микроспората.

Истражувањата за андрогенетскиот потенцијал на испитуваните сорти пиперка се изведувани според методот на Dumas de Valux et al. (1981). Според методот на овој автор, најпрво антерите се култивираат на медиумот CP + 0,01 mg/l KIN + 0,01 mg/l 2,4D, со инкубација на темно 8 дена и на $+35 \pm 2^\circ C$, следните 4 дена во клима комора на $+25 \pm 2^\circ C$ со фотопериодизам 12 h светло / 12 h темно (Слика 1a), а потоа истите се пренесуваат на медиумот R_1 + 0,01 mg/l KIN на $+25 \pm 2^\circ C$, со фотопериодизам 12 часа светло и 12 часа темно (Слика 1b). На R_1 медиумот антерите остануваат 30-40 дена каде се формираат и соматските ембриониди. Развојот и вкоренувањето на регенерантите настанува во следното префрлување на V_2 медиум (Слика 1c), од каде добро вкоренетите изданоци се спремни за адаптација на нестерилни услови.

Аклиматизацијата на добиените хаплоиди се одвиваше етапно, најпрво во клима комора каде регенерантите беа засеани во стерилна ме-

шавина на перлит : тресет : песок (1:1:1) (Слика 1e), а потоа во оранжериски услови покриени со агрилно платно заради спречување на страно-оплодност од другите генотипови (Слика 1f).

На ваков начин, со култура на антери во услови *in vitro* и аклиматизација на добиените регенеранти во надворешни услови, во 2006 година беше добиен семенски материјал само од четири генотипови. Овој материјал во 2007 година

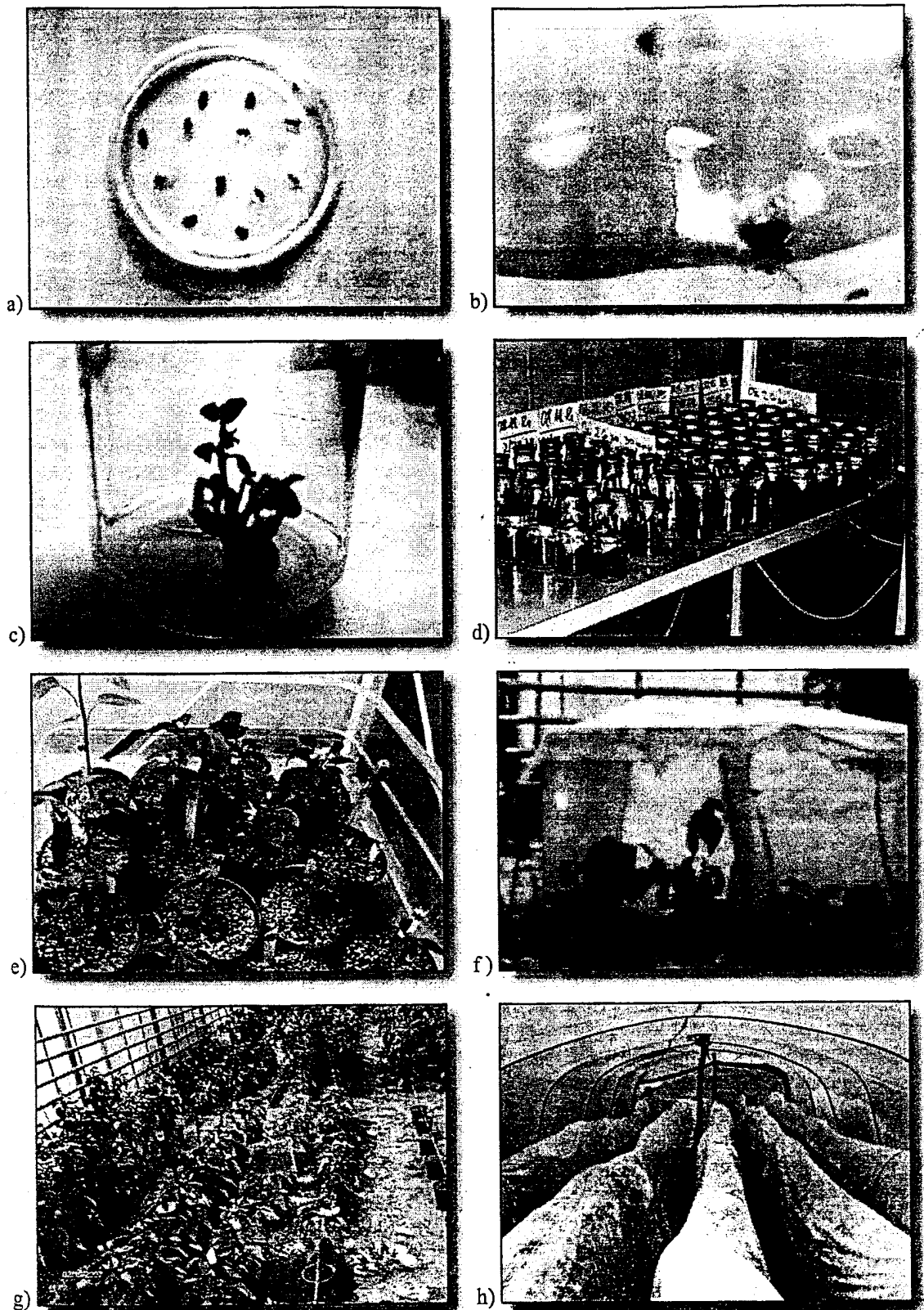
е ставен во процесот на селекција на перспективни андрогенетски линии. Испитувањата за карактеризацијата на фенотипските особини на добиените 11 линии на пиперка како и за колекција на семенскиот материјал од секоја линија посебно изведени се во оранжерија и пластеник.

Во оранжериски услови оптиот е поставен по методот на рандомизирани блокови во четири повторувања (Слика 1g) а во пластеник секоја ли-

Таб. 1. Индукција на хаплоидни ембрионди од антери на пиперка

Tab. 1. Haploid embryo induction from pepper anthers

Генотипови пиперка Pepper genotypes	Бр. на антери Nr. of anthers	Ембрио-генетски антери (%) Embryogenetic anthers (%)	Бр. на ембрионди на 100 антери Nr. of embryos per 100 anthers	Ембрио-генетски потенцијал Embryogenetic response
фехерозон Féherözön	500	17.39	36.91	Добар Good
тура Tura	300	17.05	17.05	Добар Good
притавит F1 Pritavit F1	330	9.23	9.39	Просечен Fair
златен медал CP Zlaten medal Sr	343	6.83	10.29	Просечен Fair
калифорниско чудо California wonder	151	6.16	5.66	Просечен Fair
мајори Majori	330	5.83	6.73	Просечен Fair
тиран Piran	412	5.03	34.05	Слаб Poor
доматовидна блага Tomato shaped sweet	360	4.17	4.54	Слаб Poor
златен медал ШТ Zlaten medal Št	362	3.64	14.35	Слаб Poor
куртовска капија CP Kurtovska kapija Sr	242	3.14	10.91	Слаб Poor
куртовска капија BG Kurtovska kapija BG	310	2.9	50.55	Слаб Poor
слатко лута Slatko luta	140	2.43	3.33	Слаб Poor
феферона Feferona	237	-	-	Нема No
ротунд Rotund	220	-	-	Нема No
везена лута Vezena luta	221	-	-	Нема No
бонбона Bonbona	270	-	-	Нема No
сиврија Sivrija	254	-	-	Нема No
куртовска капија TU Kurtovska kapija TU	236	-	-	Нема No
куртовска капија МК Kurtovska kapija MK	122	-	-	Нема No
кинцсем F1 HP14 Kincsem F1 HP14	300	-	-	Нема No
витамин F1 HPO13G Vitamin F1 HPO13G	300	-	-	Нема No



Сл. 1. а) Култура на антери од пиперка на индукционен CP медиум, б) Развој на соматски ембрионид на R_1 медиум, с) Вкоренување и развој на изданок на V_j медиум, е) Адаптација на регенеранти во килма комора, ф) Адаптација на регенеранти во оранжерија, г) Карактеризација на фенотип и колекција на семенски материјал во оранжерија, г) Карактеризација на фенотип и колекција на семенски материјал во пластеник.

Fig. 1. a) Pepper anther culture on induction CP medium, b) Development on somatic embryo on R_1 medium, c) Shoot rooting and development on V_j medium, e) Adaptation of regenerates in growth chamber, f) Adaptation of regenerates in glasshouse, g) Phenotype characterization and seed collection from glasshouse, h) Phenotype characterization and seed collection from plastic tunnel.

нија, до фенофазата масовно плодonoсење, беше покриена со агрилно платно (Слика 1h). Заштитата со агрилно платно е поставена за да се спречи на полинизацијата помеѓу различните линии на пиперка т.е. за обезбедување на услови на самоопрашување на секоја линија меѓусебе. Платното беше отстрането во фазата на масовно плодonoсење заради обезбедување на поволни услови за дозревање на плодовите до ботаничка зрелост.

Карактеризацијата на фенотипските особини е изведена по дескрипторот за *Capsicum* spp. по IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) за секоја линија посебно и во оранжериски и во пластенички услови а колекцијата на семенскиот материјал соодветно е складирана за секоја линија во генбанката на Земјоделскиот факултет при Универзитет „Гоце Делчев,, - Штип.

Резултати

Врз основа на добиените резултати може да се каже дека, сите испитувани сорти не се способни за формирање на хаплоидни ембриони. По индуктивниот период на CP медиум од 12 дена, антерите беа префрлувани на R₁ медиум. На овој медиум ембрионите уште на самиот почеток покажуваат тотипотентност, напредуваат во својот раст и развој и формираат изданок.

Резултатите за андрогенетскиот потенцијал на 21 испитуван генотип на пиперка во култура од антери дадени се во Табела 1. Од сите испитувани вкупно 21 генотипови на пиперка, 12 имаат способност за формирање на директни соматски ембриони. Лутите генотипови (со исклучок на *ротунд*, *куртовска капија* ТУ, *куртовска капија* МК, *кинцес* F1 HP14 и *вита-мин* F1 HPO13G), немаат андрогенетска способност т.е. во култура на антери не формираат хаплоидни изданци. Најверојатно инхибирачкото дејство на капсаицинон има влијание во формирањето на хаплоидните ембриони, така да сортите кои содржат повеќе капсаицин (лутите сорти) воопшто немаат андрогенетска способност (Колева-Гудева, 2005).

Регенерантите одлично се адаптираа од лабораториски услови во оранжериски услови каде ги поминаа сите фенофази од својот развој, а во ботаничка зрелост во септември и октомври 2006 беше колекциониран семенски материјал од 4 генотипови и тоа:

- *куртовска капија* CP (282 вкупен број на семки);
- *златен медал* CP (290 вкупен број на семки);
- *пиран* (215 вкупен број на семки) и
- *фехерозон* (424 вкупен број на семки).

Од семенскиот материјал кој беше добиен само од четирите генотипови *куртовска капија* CP, *златен медал* CP, *пиран* и *фехерозон* во истражувачката 2007 година беа поставени 11 линии на пиперка за карактеризација на фенотипот и колекција на семенскиот материјал:

- 3 линии *куртовска капија* CP (KK1; KK2; KK3) - оранжерија и пластеник;
- 2 линии *златен медал* CP (ZM1; ZM2) - само во пластеник;
- 2 линии *пиран* (P3; P4) - оранжерија и пластеник и
- 4 линии *фехерозон* (F5; F6; F7; F8) - оранжерија и пластеник.

Колекционираното семе со описот на фенотипските карактеристики по дескрипторот за *Capsicum* spp. по IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) прописно е складирано во генбанката.

Дискусија

Создавањето на хаплоиди и спонтани ди-хаплоиди во култура на антери е добро развиен и корисен метод во растителната генетика, како и во селекцијата на растенијата. Првата хаплоидна пиперка во култура на антери е добиена во 1973 год од Wang et al. Хаплоидната морфогенеза на видови од родот *Capsicum* е истражувана од George и Narayanaswamy (1973) и Kuo et al. (1973), иако продукцијата на хаплоидни индивиди била многу ниска. Првиот ефикасен метод за индукција на хаплоидна пиперка со користење на температурен стрес третман на +35°C е опишан дури во 1981 година од Dumas de Valux. Со цел да се зголеми соматската ембриогенеза, од една страна, и да се зголеми продукцијата на хаплоиди, од друга страна користени се различни стрес-третмани (Mityko et al., 1993, 1995, 1999). Андрогенезата на пиперката е доста лимитирачки процес кој е проследен со многу инхибирачки фактори како: генотипот; структурата и стадиумот на микроспорите т.е. микроспорите се погодни за индукција на андрогенеза во фазата на првата поленова митоза или непосредно пред неа; генетската предиспозиција за соматската ембриогенеза; хормоналната регулација во *in vitro* услови; условите на раст, како и многу други фактори.

Во нашите истражување методот на Dumas de Valux et al. (1981) даде солидни резултати во продукцијата на соматските ембриони. Во случај на користење на ладен стрес третман на LS и NN медиум, калусирањето е водечка појава, без можности за индукција на ембриони или за индиректна ембриогенеза (Колева-Гудева и Спасеноски, 2002).

Според класификацијата на Mityko и Fari

(1997), за андрогенетскиот потенцијал, типовите на пиперка користени во овие истражувања се: 2 генотипови со добар андрогенетски потенцијал: *фехерозон* и *тура*; 4 генотипа со просечен андрогенетски потенцијал: *притавит* F1, *златен медал* CP, *калифорниско чудо* и *мајори*; 6 генотипови со слаб андрогенетски потенцијал: *пиран*, *даматовидна блага*, *златен медал* ШТ, *куртовска капија* МК, *куртовска капија* BG и *слатко лута*; и 9 генотипови немаат андрогенетски потенцијал: *феферона*, *ропунд*, *везена лута*, *бонбона*, *сиврија*, *куртовска капија* TU, *куртовска капија* МК, *кинцсем* F1 HP14 и *витамин* F1 HPO13G.

Заклучок

Резултатите од овие истражувања покажаа дека соматски ембриониди се формираат на CP медиум и тоа од сите 21 испитувани генотипови, 12 или 58% покажаа способност за формирање на ембриониди, а 4 генотипови или 19% формираат семе. Утврдена е методологијата на работа и оптимизирани се условите за индукција на ембриониди во култура на антери кај пиперка со што зголемена е ефикасноста на методологијата до ниво на завршна технологија. Со тоа се зголемува можноста за проучување на хаплоидни и дихаплоидни растенија-регенеранти, кои пак од друга страна се вклучени во селекционите процеси за создавање на нови сорти и хибриди на пиперка.

Од 4 генотипови започнат е процесот на селекција на андрогенетските линии, кои се хомозиготни дупли хаплоиди. Карактеризацијата на фенотипот како и колекционирањето на семе од андрогенетските линии, отвара можност за следење на карактеристиките на хомозиготни линии на пиперка, проучување на сличностите и разликите помеѓу новите хомозиготни линии и стандардните генотипови од кои тие потекнуваат.

Хомозиготноста дава можност за вклучување во процесот на селекција на наследен материјал од кои би се одбирале потребни и пожелни карактеристики, во поглед на принос, квалитет на плодови, отпорност на болести и штетници итн., а со тоа се подобрува и разновидноста на земјоделските култури.

Литература

- Dumas de Valux, R., Chambonnet, D. & Pochard, E. (1981). *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) Anthers: high rate plant production from different genotypes by + 35°C treatments. *Agronomie* 1(10): 859-864.
- George, L. & Narayanaswamy, S. (1973). Haploid capsicum through experimental androgenesis.

Protoplasma (78): 467-470.

Koleva-Gudeva, L., Spasenovski, M. & Trajkova, F. (2007). Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horticulturae* (111): 114-119.

Колева-Гудева, Л. (2005). Капсаицин може инхибирачки фактор во андрогенезата на пиперката, Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури, (4/5): 75-83.

Колева-Гудева, Л. (2003). Култура на антери од пиперка (*Capsicum annuum* L.), Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури, (3): 95-102.

Колева-Гудева, Л. (2003). Влијание на инкубациониот третман врз андрогенезата на пиперка (*Capsicum annuum* L.), Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури, (3): 87-95.

Колева-Гудева, Л. и Спасеноски, М. (2002). Индукција на калус од антери на пиперка. Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури, (2): 59-68.

Kuo, J.S., Wang, Z.Z., Chien, N.F., Ku, S.J., Kung, M.L. & Hsu, H.C. (1973). Investigation of the anther culture in vitro of *Nicotiana* and *Capsicum annuum* L. *Acta Bot. Sin.* 15 (1): 43-47.

Mityko, J., & Fari, M. (1997). Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture, *Hort. Biotech and breeding*, ISHS 1997, *Acta Hort.* (447): 281-287.

Mityko, J., Andrasfalvy, G., Csillery, G. & Fary, M. (1995). Anther culture response in different genotypes and F₁ hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.), *Plant Breeding* (114): 78-80.

Mityko, J. (1993). Obtention of Anther derived homozygous plants in pepper (*Capsicum annuum* L.), OMFB, Hungary No. 93-97-44-0468.

Wang, J.J., Sun, C.S., Wang, C.C. & Chein, N.F. (1973). The induction of pollen plantlets of *Triticale* and *Capsicum annuum* from anther culture. *Sci. Sinica* XVI (1): 147-151.

APPLICATION OF ANDROGENESIS AS A METHOD FOR IMPROVEMENT OF CROPS

Liljana KOLEVA-GUDEVA¹, Fidanka TRAJKOVA¹ and Mirko SPASENOSKI²

¹ Goce Delcev University, Faculty of Agriculture,
Krste Misirkov b.b. P.O. 201, 2000 Stip, Republic of Macedonia

² Ss. Cyril and Methodius University, Faculty of Natural Sciences and Mathematics,
Institute of Biology, Arhimedova 5, P.O. 162, 1000 Skopje, Republic of Macedonia

Summary

The aim of our experiments was establishment of effective *in vitro* technology to study haploid and diploid plant regenerates; induction of embryogenesis in pepper anther culture; development of embryos into regenerates as well as successful adaptation and acclimatisation of regenerates from sterile to greenhouse conditions.

Induction of somatic embryogenesis was successful in 12 out of 21 examined pepper genotypes using the method of Dumas de Valux et al. (1981). Two pepper genotypes (Féherözön and Tura) showed good embryogenetic response, four pepper genotypes showed fair embryogenetic response (Pritavti F1, Zlaten medal Sr, California Wonder and Majori), six pepper genotype showed poor embryogenic response (Tomato shaped sweet, Zlaten medal Št, Kurtovska kapija Sr, Kurtovska kapija BG and Slatko luta) while nine pepper genotypes did not show any embryogenic response (Feferona, Rotund, Vezena luta, Bonbona, Sivrija, Kurtovska kapija TU, Kurtovska kapija MK, Kincsem F1 HP14 and Vitamin F1 HPO13G). Embryos from four genotypes (Piran, Kurtovska kapija Sr, Zlaten Medal Sr and Féherözön) were effectively regenerated into plantlets. Firstly, the androgenic plantlets were grown in sterile mixture in growth chamber and after they were transferred in greenhouse conditions for acclimatisation. During October and November 2006 seed material from the acclimatised androgenic plants in the greenhouse was collected. In 2007, the collected seed material was used as a starting material for phenotype characterisation of 11 androgenic pepper lines according to the Descriptor for *Capsicum* spp. by IPGRI (International Plant Genetic Recourse Institute). The experiment was carried out in greenhouse and plastic tunnel conditions. Also, seed material from the 11 androgenic pepper lines was collected and properly stored in the gene bank of the Faculty of Agriculture, Goce Delcev University - Stip.

The collected seed material, as a final product of the androgenesis, is an excellent possibility for further breeding processes, cytogenetics and other molecular level research studies.